

**Plan d'appui scientifique à la recherche prénormative dans le
secteur alimentaire dans un contexte de développement durable**

**Stratégie intégrée d'analyse qualitative et
quantitative des résidus de substances
antimicrobiennes dans les denrées alimentaires**

Guy MAGHUIN-ROGISTER, Amaya JANOSI and Vincent HELBO,
Université de Liège (ULg)

Carlos VAN PETEGHEM, Ellen SANDERS and Nico VAN EECKHOUT,
Universiteit Gent (UG)

Marc CORNELIS and Martine JOURET,
Institute of Veterinary Inspection, Brussels (IEV/IVK)

Contrat NP/12/35

Services scientifiques du premier Ministre
Affaires scientifiques, techniques et culturelles
(SSTC)

RESUME OPERATIONNEL

L'apport de notre consortium au Plan d'Appui comporte deux volets :

- *Volet 1* : La normalisation de l'analyse des résidus d'hormones et de médicaments à usage vétérinaire dans les produits animaux
- *Volet 2* : Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances antimicrobiennes dans les denrées alimentaires.

1.1 La normalisation de l'analyse des résidus d'hormones et de médicaments à usage vétérinaire dans les produits animaux

(Mars 1997 à février 1998)

Nous avons créé une base de donnée nouvelle qui présente un inventaire critique des méthodes disponibles pour la détermination des résidus de promoteurs de croissance (hormones anabolisantes stéroïdes, β -agonistes et glucocorticoïdes) et de médicaments à usage vétérinaire (antibiotiques et inhibiteurs de croissance des microorganismes). D'autres parties de la base de données contiennent des informations :

- d'ordre législatif (belge et européen),
- sur les aspects toxicologiques de ces résidus
- sur les statistiques des contrôles effectués par les organismes officiels (Ministère de l'Agriculture et Institut d'Expertise vétérinaire du Ministère de la Santé publique).

Cette base de donnée est accessible à l'adresse INTERNET : <http://139.165.180.63/OSTC/>

1.2 Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances antimicrobiennes dans les denrées alimentaires.

(Mars 1998 à juillet 2001)

Le projet avait pour but de démontrer la faisabilité d'une stratégie intégrée en vue du contrôle des résidus de substances à activité antimicrobienne dans les denrées alimentaires d'origine animale. Cette stratégie est basée sur l'utilisation de méthodes de dépistage disponibles sur le marché, telles que des dosages immunochimiques ou d'autres tests biochimiques et physicochimiques rapides et relativement bon marché, ainsi que sur une méthodologie physicochimique, de confirmation et d'analyse quantitative, considérée actuellement comme faisant partie intégrante d'un laboratoire bien équipé de contrôle des denrées alimentaires.

Une méthodologie pilote pour l'identification, la confirmation et la détermination quantitative des résidus des substances antibactériennes les plus couramment utilisées en productions animales a été mise au point. Après validation, selon des normes généralement admises au niveau international, la méthodologie a été appliquée en pratique sur des échantillons réels collectés en abattoirs par les inspecteurs de l'Institut d'Expertise vétérinaire (IEV), échantillons qui avaient fait l'objet d'un premier contrôle positif pour la présence d'antibactériens au moyen du test officiel belge (nouveau test rénal, Arrêté ministériel du 19 juin 1995). Nous disposons également d'échantillons de reins et de viande provenant d'animaux reconnus comme négatifs pour la présence d'antibactériens dans leur rein lors du contrôle officiel. Ces derniers échantillons nous ont servi de « blancs » pour la mise au point des méthodes d'analyse et dans nos contrôles de qualité.

Actuellement, le test appliqué pour déterminer si un échantillon est positif ou négatif, est le « test rénal belge ». Ce test microbiologique de *pre-screening* (premier dépistage), appliqué sur les reins des animaux abattus, se base sur l'activité antimicrobienne des antibiotiques. Il permet uniquement de détecter la présence de substances inhibitrices dans l'exsudat rénal. Mais il ne permet pas d'identifier la substance concernée et encore moins de

la quantifier dans les parties consommables de la carcasse et en particulier dans la viande. C'est pourquoi, pour progresser dans l'application des LMRs, des méthodes de dépistage simples et rapides d'identification des antibiotiques doivent être appliquées. Celles-ci viendront compléter l'information obtenue lors du test rénal.

Pour rendre la stratégie de contrôle des résidus plus efficace, il faudrait idéalement établir un plan en quatre phases :

Phase 1: Le *pre-screening* (ou test de premier dépistage)

Cette étape est déjà opérationnelle dans le contrôle sanitaire en Belgique et ces tests sont effectués dans un vingtaine de laboratoires agréés. Il s'agit du test, pratiqué sur les reins des animaux d'abattoir, connu sous le nom de « test rénal » ou « nouveau test rénal belge »

Le test de dépistage utilisé actuellement, permet uniquement de détecter la présence d'antibactériens dans les échantillons.

Phase 2: Le *screening* (ou dépistage sélectif)

Les échantillons donnant une réponse positive lors du *pre-screening* sont soumis au dépistage sélectif. Lors de ce *screening*, on tente d'identifier plus précisément la famille à laquelle appartient la substance active repérée. Cette détection se fait au moyen d'immuno-essais, ou d'autres tests biochimiques, commercialisés sous différents formats ou encore grâce à d'autres techniques de dépistage comme la chromatographie sur couche mince.

Phase 3: La confirmation et l'identification

Un résultat positif lors d'un test de dépistage doit être considéré comme potentiellement douteux en raison d'interférences possibles (risque de faux positifs). Il doit donc être confirmé au moyen d'une méthode d'analyse dont le principe de détection est différent de celui de la méthode de dépistage. On entend par identification la distinction de la substance responsable du résultat positif lors du dépistage par rapport à des substances de structures analogues. Du fait que les valeurs de LMR peuvent varier d'une substance à l'autre au sein d'une même famille d'antibiotiques (par exemple les β -lactames) une identification non ambiguë du résidu est indispensable.

Les techniques les plus utilisées, tant pour la confirmation que pour l'identification, sont des chromatographies liquides (LC) couplées à différents détecteurs spectrométriques (LC-UV, LC-MS, LC-MS/MS, ...).

Phase 4: La quantification de la teneur en résidus

En principe, la méthode d'analyse de confirmation et/ou d'identification, basée sur la chromatographie liquide, peut être appliquée de manière quantitative (calibration au moyen d'un standard interne ou au moyen d'une courbe standard à différentes dilutions).

Les trois dernières étapes n'étant pas encore d'application systématique, le but de ce projet était de démontrer la faisabilité de cette stratégie intégrée. Le choix des antibiotiques analysés est basé sur l'expérience acquise dans chaque laboratoire pour certaines familles d'antibiotiques ainsi que sur la disponibilité sur le marché de dosages immuno-chimiques ou d'autres tests biochimiques. Quant aux analyses de confirmation, elles sont réalisées par des méthodes d'analyses physico-chimiques généralement disponibles dans un laboratoire de contrôle bien équipé.

Les substances antibactériennes les plus souvent rencontrées dans les tissus et produits animaux appartiennent à l'une des sept familles d'agents antibactériens : les β -lactames, (fluoro)quinolones, macrolides, phénicolés, tétracyclines, aminoglycosides et les sulfonamides.

L'expérience passée des services du Ministère de la Santé publique lors du contrôle des résidus dans les produits animaux a montré que les sulfonamides, les tétracyclines et les β -lactamines sont plus souvent mises en évidence par rapport aux autres antibiotiques. C'est la raison pour laquelle, seuls les échantillons positifs lors du pre-screening qui s'étaient révélés négatifs pour l'une de ces trois familles, ont été soumis aux analyses portant sur le chloramphénicol, les aminoglycosides et les macrolides.

Resultats

Onderzoek uitgevoerd aan de Universiteit Gent

Het gedeelte van het onderzoek dat aan de Universiteit Gent toevertrouwd werd betrof de sulfonamiden, de tetracyclines en de groep van de aminoglycosiden.

Sulfonamiden

Screening

Aangezien er geen commerciële multiresidu sulfonamide ELISA kits op de markt zijn, werd High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) gekozen als screeningstechniek. Na ontwikkeling met HPTLC konden de vlekken van de residuen visueel vlot geëvalueerd worden op het MRL niveau (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Het extractierendement was zeer hoog en er werden geen interferenties waargenomen. Er kunnen 30 stalen per dag door één technicus geanalyseerd worden. In totaal werden 161 monsters (nier + spiervlees) met deze methode geanalyseerd, waarvan 21 (13 %) positief bevonden werden op sulfonamiden.

Confirmatie met LC-MS/MS

Er werd een eenvoudige extractieprocedure op punt gesteld. De methode werd na optimalisatie van zowel de chromatografische als de massaspectrometrische parameters, gevalideerd met betrekking tot lineariteit, juistheid, precisie, detectielimiet (LOD) en bepaalbaarheidsgrens (LOQ) zowel voor nierweefsel als voor spierweefsel. Daaruit bleek dat zij voldoet aan alle eisen die ter zake kunnen worden gesteld.

Van de 42 monsters (nieren en spierweefsel) die als positief uit de screening gekomen waren konden er 28 (67 %) ondubbelzinnig geconfirmeerd worden met de LC-MS/MS methode. Dit betekent dat er ongeveer 1/3 van de stalen, die als positief uit de screening gekomen waren in werkelijkheid vals positieven waren.

Tetracyclines

Screening

De bruikbaarheid van de commerciële Ridascreen tetracycline kit van R-Biopharm werd geëvalueerd.

In totaal werden 104 vleesstalen en 99 nierstalen, die positief werden bevonden met de Belgische Niertest, gescreend. Van de vleesstalen bleken 28 (27 %) meer dan 100 ppb (MRL) aan tetracyclines te bevatten. Van de nierstalen testten 13 stalen positief op tetracyclines. In totaal werden 41 monsters positief bevonden.

Confirmatie met LC-MS/MS

Er werd een eenvoudige extractieprocedure op punt gesteld. De analyses werden uitgevoerd op dezelfde apparatuur als voor de sulfonamiden.

De methode werd na optimalisatie van zowel de chromatografische als de massaspectrometrische parameters, gevalideerd.

Van de 41 monsters (nieren en spierweefsel) die als positief uit de screening methode gekomen waren, konden er 20 ondubbelzinnig geconfirmeerd worden met de LC-MS/MS. Dit betekent dat ongeveer de helft van de in de screening positief bevonden stalen in werkelijkheid vals positieven waren.

Aminoglycosiden

Screening

Als vertegenwoordiger van deze vrij grote groep werd neomycine uitgekozen, dat zelf bestaat uit een mengsel van neomycine A,B en C. Diverse commerciële kits zijn beschikbaar. Na een korte vergelijkende studie werd geopteerd voor de Neomycine EIA kit van Euro-Diagnostica. Er werd een grote variatie in de meetresultaten vastgesteld, die tijdens de looptijd van het project niet onder controle kon gekregen worden. Die variatie zou kunnen te wijten zijn aan het sterk wisselend extractierendement. Door de eenvoud van de monstervoorbereiding kunnen tot 40 stalen per dag door één technicus geanalyseerd worden.

Van de ter beschikking gestelde stalen, die nog niet positief bevonden waren op sulfonamiden of tetracyclines, in casu 65 nieren en 66 vleesmonsters, testten 7 nieren (11 %) en 5 vleesmonsters (8 %) positief op neomycine. Gezien het hoger vastgestelde gebrek aan precisie was het niet duidelijk of de meetwaarden al dan niet boven de MRL-waarde lagen.

Confirmatie met LC-MS/MS

Gezien de problemen met de grote variatie in het extractierendement is geen aanvang kunnen gemaakt worden met de LC-MS confirmatie.

Travaux effectués à l'ULg

De part l'expérience passée de chaque laboratoire pour certains antibiotiques, le Laboratoire d'Analyse des Denrées alimentaires de l'ULg s'est focalisé sur la détection et l'analyse des antibiotiques de la famille des β -lactames, des phénicolés (chloramphénicol), des quinolones et des macrolides.

Antibiotiques à noyau β -lactames

Screening

Nous avons adapté, validé et utilisé le nouveau test Beta-STAR (UCB Bioproducts). Ce test, initialement conçu pour le lait, a été adapté aux tissus animaux, rein et muscle. Dans ce cas le test sur tigelette est précédé d'une purification en phase solide de l'extrait aqueux contenant les antibiotiques. Dans ces conditions, la pénicilline G, l'ampicilline et l'amoxicilline sont détectées à des concentrations proches de leur LMR. L'oxacilline et la cloxacilline sont détectées quant à elles à des concentrations minimales inférieures à leur LMR/2.

Confirmation / quantification

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été choisie comme méthode analytique pour confirmer la présence d'antibiotiques à noyau β -lactame dans les échantillons. L'analyse HPLC appliquée aux principaux antibiotiques de la famille a permis leur identification et leur détermination quantitative. Il est néanmoins impératif avec ces composés de prendre des précautions pour éviter leur dégradation en cours d'analyse.

La limite de détection a été évaluée à 15 et 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ selon l'antibiotique analysé. La limite de quantification est de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour la pénicilline G, l'amoxicilline et l'ampicilline, et de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour l'oxacilline et la cloxacilline. Cette méthode d'analyse répond donc aux

exigences du règlement CEE 2377/90 du Conseil du 26 juin 1990 qui a fixé les limites maximales de résidus d'antibiotiques de type β -lactames dans le rein à 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour la pénicilline G, l'amoxicilline et l'ampicilline, et à 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour l'oxacilline et la cloxacilline.

Parmi les échantillons qui ne s'étaient pas révélés positifs pour les tétracyclines ni les sulfonamides, à savoir 17 échantillons de reins, un seul était positif au screening pour la présence de β -lactames. Il fut confirmé pour la présence d'ampicilline à une concentration de 1553 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Chloramphénicol

Screening

La méthode utilisée pour déterminer la présence du chloramphénicol dans les tissus est un dosage immunochimique (ELISA Ridascreen). Elle a été validée et appliquée aux échantillons de reins collectés par l'IEV.

Confirmation / quantification

Une méthode d'analyse par LC/MS/MS a été mise au point pour l'analyse quantitative du chloramphénicol.

Parmi les échantillons qui ne s'étaient pas révélés positifs pour les tétracyclines ni les sulfonamides, à savoir 17 échantillons de reins, 4 étaient positifs au screening et leurs concentrations ont été estimées à 0,4, 0,6 (2) et 1,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Quinolones

Screening

Actuellement, il n'existe pas sur le marché de test de screening multi-résidus développé pour la famille des quinolones. Une recherche, subsidiée par le Ministère fédéral de l'Agriculture et l'IEV, est en cours à ce sujet.

Nous sommes dès lors directement passés à la technique de confirmation par LC/MS/MS.

Confirmation / quantification

Les conditions d'extraction et de purification des principales substances de cette famille ont été déterminées. L'approche de l'analyse des (fluoro)quinolones, réalisée dans le cadre de ce projet, indique que la méthode utilisée par spectrométrie de masse en tandem couplée à une chromatographie liquide (LC/MS/MS) convient à l'analyse multi-résidus attendue. Cependant, si les résultats sont plus qu'encourageants, l'acquisition récente d'un standard deutéré nous permettra de réaliser une validation plus approfondie et complète de manière à pouvoir soumettre cette technique comme méthode officielle pour l'analyse des (fluoro)quinolones.

Macrolides

Screening

La méthode utilisée pour détecter les macrolides est un radio-récepteur essais mis au point et validé dans notre laboratoire. Cette technique a été utilisée pour l'analyses des échantillons de reins et de viande fournis par l'IEV.

Confirmation / quantification

Une méthode d'analyse par LC/MS/MS a été mise au point pour l'analyse quantitative des macrolides.

Parmi les échantillons qui ne s'étaient pas révélés positifs pour les tétracyclines ni les sulfonamides, à savoir 17 échantillons de reins, un seul était positif au screening pour la présence de macrolides Il fut confirmé pour la présence de spiramycine à une concentration de 93,5 µg/kg.

Résumé des résultats

Résultats de l'analyse des 17 échantillons réels positifs au test rénal et soumis aux tests de screening et de confirmation pour les antibiotiques de la famille des tétracyclines(TC) des sulfonamides (sulfo), des β -lactames, des phénicolés (CAP) et des macrolides.

échantillons:	TC	Sulfo	B-lactames	CAP	Macrolides
1					
2					
3					
4					
5					
7					
8					
14					
15					
16	+-			1,2 ng/g	
20	+-				
21					
23				0,6 ng/g	
25					
27					
28	+-			0,4 ng/g	
29					
35	+-		ampi 1553 ng/g		
38					
44					
45					
47	+-	+-			
51					
55					
59					
61	+-			0,6 ng/g	
63	+-				
65					
67	+-				
68					
69					
73					
74					
80					
81					
84					
85					

Relations avec d'autres laboratoires ou institutions aux niveaux national et international

CRIOC : Centre de recherche et d'information des organisations de consommateurs

Le OIVO/CRIOC est informé des résultats du projet et nous collaborerons avec eux pour les aider à transcrire ces résultats à destination des consommateurs. Cette action devrait affaiblir et même éliminer la « chimiophobie » fréquemment observée chez les consommateurs à propos des résidus de médicaments vétérinaires, des antibiotiques en particulier. En sachant que, même si le test rénal est positif, la concentration en résidus dans la denrée, en l'occurrence la viande, demeure en deçà de la limite maximum de résidus (LMR) autorisée. Notre projet pourrait aboutir à la conclusion, rassurante pour les consommateurs, que le test rénal officiel offre une protection efficace contre la présence de résidus, dangereux pour la santé humaine, dans les tissus animaux consommables comme aliments.

Autres utilisateurs potentiels des résultats

Les trois partenaires principaux du projet ont eu de nombreux contacts, entre eux mais aussi au niveau international. En effet, nous avons interagi avec d'autres institutions, laboratoires et organisations de consommateurs ou gouvernementales à l'occasion de réunions scientifiques (EURORESIDUE Conference, International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, OSTC Symposium on the Sustainable Development, OSTC Study Day on Pre-normative Research in the Food Sector, Analytica 2000, ...) ainsi qu'à l'occasion de consultations de l'Union européenne et de contacts informels avec des anciens partenaires dans des réseaux financés par l'UE tels que :

- Concerted Action N° 8 "In Vitro Toxicological Studies and Real-Time Analysis of Residues in Food"
- Programs of Production and Validation of Reference Materials.

Plus précisément, le professeur Van Peteghem (Université de Gand) est l'organisateur du "International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis". Il est aussi impliqué directement dans l'organisation de EURORESIDUE Conference. Il a été récemment désigné comme membre du Comité scientifique de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire (AFSCA). Prof. Cornelis (IEV/IVK et Universiteit Gent) est le délégué belge officiel à l'EMEA (European Agency of (Veterinary) Medicinal Products) et au Codex Alimentarius.

Actuellement d'autres laboratoires et centres de recherches sont associés à certains aspects de nos projets plus particulièrement en ce qui concerne le développement de nouvelles méthodes lorsque les méthodes existantes, disponibles commercialement ou publiées, ont été jugées peu performantes pour notre propos. Parmi ces instituts et laboratoires, citons : l'Institut des Matériaux et méthodes de référence (IRMM), le Laboratoire d'Hormonologie animale du CER à Marloie, la Section « Bromatologie » de l'Institut scientifique de la Santé publique – Louis Pasteur (ISP-LP) à Bruxelles, le Laboratoire communautaire de Référence (AFSA, Fougères, France), l'Institut Pasteur de Lille (France).

Conclusions et recommandations

Les importantes modifications de stratégie du contrôle des résidus dans les denrées alimentaires et dans les produits alimentaires imposés par la directive européenne 96/23/CE et le Règlement du Conseil CEE N°2377/90 qui sont entrés pleinement en application récemment requièrent aussi une modification de la stratégie d'utilisation par les laboratoires

de contrôle des méthodes d'analyse pour la détermination des résidus de médicaments vétérinaires et particulièrement des antibiotiques.

Pour ces derniers composés, on doit se poser la question de savoir si la démonstration de la présence de substances inhibant la croissance bactérienne est encore suffisante pour justifier la saisie de la carcasse de l'animal. Les dispositions européennes nouvellement entrées en vigueur nécessiteraient l'identification de la substance antibactérienne, suivie de la détermination de sa concentration dans le produit animal comestible pour le consommateur humain et de la comparaison de sa valeur avec celle de la LMR dans la denrée correspondante. Des méthodes d'analyse quantitative fiables et reproductibles sont donc nécessaires. Ceci ne sera possible qu'après la validation complète et la normalisation des méthodes d'analyse.

Jusqu'à présent, notre projet a atteint en grande partie ses objectifs, à savoir :

- établir un inventaire des outils de contrôle constitués de méthodes disponibles commercialement pour le post-screening des résidus d'antibiotiques ;
- appliquer des méthodes physicochimiques publiées dans la littérature scientifique pour les analyses de confirmation et la quantification des antibiotiques dans les échantillons de reins récoltés dans les abattoirs belges. Celles qui ont été évaluées comme satisfaisantes, ce qui est le cas pour les tétracyclines, les aminoglycosides, les sulfonamides, les macrolides et les antibiotiques à noyau β -lactames, ont été validées en grande partie et sont quasi prêtes pour une évaluation inter-laboratoire ;
- des approches analytiques nouvelles ont été suivies lorsque les méthodes existantes n'ont pas été considérées comme suffisamment performantes comme dans le cas des (fluoro)quinolones ;
- des progrès ont aussi été réalisés dans le développement des réseaux de laboratoires aux niveaux belge et européen dans le domaine du contrôle des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale.

Notre projet était clairement en concordance avec les objectifs généraux du Plan d'appui scientifique pour une politique de développement durable dans le secteur des produits alimentaires pour l'harmonisation des méthodes d'analyse. Cela devrait permettre une meilleure protection de la santé du consommateur en ce qui concerne les résidus potentiellement dangereux de certains médicaments vétérinaires tels que les antibiotiques.

La validation des méthodes analytiques développées et testées dans notre projet devra encore être complétée en collaboration étroite avec d'autres laboratoires impliqués dans le contrôle officiel des résidus. Ceci contribuera à l'intégration des résultats et permettra l'identification des domaines dans le secteur de la chaîne de production alimentaire pour lesquels un effort de normalisation est encore nécessaire dans le cadre du développement durable. Le projet devra contribuer à la mise sur pied d'un inventaire des initiatives aux niveaux européen et mondial et au développement de banques de données facilement accessibles. Il examinera les actions menées en Belgique et au niveau international dans le domaine des normes des produits alimentaires (plus précisément, les méthodes d'analyse des résidus dans les produits d'origine animale) dans un contexte de développement durable et il permettra la définition de la contribution belge au niveau international, plus spécialement au niveau européen.